

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Jelínková

Porcelánová nemoc u raků: biologie, dopady a rozšíření

Porcelain disease in crayfish: biology, impacts and distribution

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Eva Balcarová

Konzultant: Adam Petrusek

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2015

Podpis

Abstrakt

Porcelánová nemoc je onemocnění postihující raky způsobované mikrosporidii *Thelohania contejeani*. Tento vnitrobuněčný parazit napadá svalové buňky hostitele, které postupně vyplní sporami. Tím vzniká pro toto onemocnění charakteristické bělavé či opaleskující zabarvení abdominálního svalstva raků. Parazit takto postupně napadá další svalová vlákna, což pravděpodobně vede ke snížení pohybové aktivity napadeného jedince a následné smrti. Ačkoli *T. contejeani* nepředstavuje při nízké prevalenci pro račí populace vážné ohrožení, a není tedy tak zásadní hrozbou jako račí mor, bylo v souvislosti s ní popsáno několik masových úhynů raků. Tato práce shrnuje základní poznatky o infekci tímto parazitem, rozebírá její dopady na hostitele a faktory, které mohou šíření a rozvoj nemoci ovlivnit. Také popisuje životní cyklus *T. contejeani*, sumarizuje dosud zaznamenané případy výskytu tohoto parazita a hodnotí rizika, která pro račí populace znamená. Závěrem jsou popsány metody, kterými je možné nákazu detekovat.

Klíčová slova: *Thelohania contejeani*, porcelánová nemoc, rak, mikrosporidie, parazit, sval

Abstract

The porcelain disease is a disease affecting crayfish caused by the microsporidium *Thelohania contejeani*. This intracellular parasite attacks muscle cells of the host and fills them with spores. This leads to white or opaque colouration of the abdominal muscle of crayfish, which is characteristic for this disease. The parasite gradually attacks more muscle fibers which probably leads to decrease of locomotor activity of affected crayfish and finally may result in their death. *T. contejeani* at low prevalences does not represent a real danger to crayfish populations and thus it is not as serious threat as crayfish plague. However, it has been associated with several cases of mass mortalities too. This thesis summarizes essential findings about infection by this parasite, analyzes its impacts to the host and factors that can influence transmission and progress of this disease. It also describes a life cycle of *T. contejeani*, summarizes records of the occurrence of this parasite and evaluates risks which it poses to crayfish populations. Finally, methods used to detect infection are described.

Keywords: *Thelohania contejeani*, porcelain disease, crayfish, microsporidia, parasite, muscle

OBSAH

1.	Úvod.....	1
2.	Taxonomické zařazení <i>Thelohania contejeani</i>	2
3.	Příznaky infekce a vliv na nakažené raky.....	3
3.1	Vliv infekce na pohyblivost raků.....	4
3.2	Vliv na růst, rozmnožování a chování raka	4
4.	Životní cyklus <i>T. contejeani</i>	5
4.1	Infekční fáze	5
4.2	Merogonie.....	6
4.3	Sporogonie.....	7
4.3.1	První typ sporogonie	7
4.3.2	Druhý typ sporogonie	8
5.	Přenos <i>T. contejeani</i>	9
5.1.	Horizontální přenos	9
5.1.1.	Přímý přenos spor	9
5.1.2.	Nepřímý přenos spor	12
5.2.	Vertikální přenos	12
6.	Faktory ovlivňující rozvoj porcelánové nemoci a prevalenci nákazy.....	13
6.1	Druh hostitele	13
6.2	Pohlaví a věk raků	14
6.3	Vlastnosti populace.....	14
6.4	Teplota prostředí.....	14
6.5	Ekdyse	15
6.6	Stres	15
7.	Výskyt a prevalence <i>T. contejeani</i>	15
8.	Rizika porcelánové nemoci a opatření proti nim	18
9.	Metody detekce <i>T. contejeani</i>	19
9.1.	Vizuální kontrola	19
9.2.	Mikroskopické vyšetření	20
9.2.1.	Světelný mikroskop.....	20
9.2.2.	Elektronový mikroskop	21
9.3.	Molekulární metody	21
9.3.1.	Vypreparování a uchování vzorku tkáně.....	21
9.3.2.	Extrakce DNA	21
9.3.3.	<i>Nested PCR</i>	22
9.3.4.	LAMP metoda.....	24
10.	Závěr	27
11.	Seznam použitých zkratk	29
12.	Seznam literatury	30

1. Úvod

Raci (Astadida) patří mezi největší bezobratlé živočichy sladkých vod. Mají nepopíratelný význam pro vodní ekosystémy. Jsou to všežravci s velkým spektrem přijímané potravy. Loví nejen vodní bezobratlé a ryby (spíše oslabené jedince), ale živí se také vodními rostlinami, nárosty řas a detritem (Kozák a kol., 2013). Zároveň sami raci slouží jako potrava rybám, vydrám a ptákům (Štěpán, 1932-33). Jsou tedy významnou součástí potravních řetězců ve sladkovodním prostředí. Díky své velikosti a snadné odlišitelnosti od jiných organismů jsou považováni za vhodné bioindikátory kvality vody (Ďuriš a kol., 2013). V některých zemích mají raci také ekonomický význam jako součást tradičního jídelníčku (Holdich a kol., 2006).

V dnešní době jsou však na našem území populace původních druhů raků (rak kamenáč *Austropotamobius torrentium*, rak říční *Astacus astacus*) ohroženy. Hrozbu představuje například invaze agresivnějších nepůvodních druhů raků (rak signální *Pacifastacus leniusculus*, rak pruhovaný *Orconectes limosus*), kteří přenášejí onemocnění známé jako račí mor. Ten v minulém století do značné míry původní populace zdecimoval (Diéguez-Urbeondo a kol., 2006; Kozubíková a Horká, 2013). Kromě račího moru byly ve 20. století populace našich raků také zatěžovány přibýváním znečištěných vod důsledkem průmyslového rozvoje, používáním chemikálií v zemědělství, nešetrnými úpravami břehů nebo zanášením toků sedimenty (Krupauer, 1968; Štambergová a kol., 2009). Dnes jsou oba naše původní račí druhy zařazeny do Červeného seznamu ohrožených druhů České republiky: *A. torrentium* jako kriticky ohrožený a *A. astacus* jako ohrožený (Štambergová a kol., 2005). Je tedy potřeba nejen zajistit pro tyto druhy vhodné životní podmínky, ale také sledovat jejich zdravotní stav.

Za druhé nejzávažnější onemocnění raků po račím moru je považována porcelánová nemoc (Alderman a Polglase, 1988, podle Edgerton a kol., 2002). Jedná se o pokročilý stav infekce raka mikrosporidii rodu *Thelohania* s vizuálním projevem – bílým zbarvením zadečkové svaloviny (Imhoff a kol., 2009). Mikrosporidie způsobují podobné příznaky nejen u raků, ale i u jiných korýšů, například krevet či krabů, kde je onemocnění označováno jako „cotton disease“ nebo „milk disease“ (Iversen a Kelly, 1976; Ryazanova a Eliseikina, 2010). Mikrosporidii, jež způsobují porcelánovou nemoc u raků, je několik druhů, nicméně v evropských populacích byl zatím zaznamenán pouze jeden druh – *T. contejeani*. Proto se

v této bakalářské práci hodlám zabývat *T. contejeani* a pojmem porcelánová nemoc budu myslet nemoc způsobovanou právě tímto parazitem.

Ačkoli račí mor je již pojem známý i mezi laiky, povědomí o porcelánové nemoci je v České republice i mezi odbornou veřejností nízké. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o porcelánové nemoci způsobované *T. contejeani* – rozebrat biologii této mikrosporidie, shrnout záznamy o jejím výskytu ve světě, zhodnotit rizika, která přináší, a popsat metody, kterými je možné ji diagnostikovat.

2. Taxonomické zařazení *Thelohania contejeani*

T. contejeani patří do skupiny Microsporidia. Mikrosporidie jsou vnitrobuněční houbám příbuzní parazité, kteří napadají obrovskou škálu hostitelů od bezobratlých až po člověka. Životní cyklus některých mikrosporidií zahrnuje i více různých hostitelů (Nylund a kol., 2010). Tyto organismy jsou zajímavé tím, že některá jejich životní stádia (např. meronti) se vyznačují velice primitivními charakteristikami (jako nedokonalý Golgiho aparát nebo mitosomy namísto mitochondrií), ale zároveň spory jsou vybaveny velmi sofistikovaným vytlačovacím aparátem (Vávra a Larsson, 2014).

Celý klad Microsporidia si v posledních dvou dekáдах prošel zásadními změnami v náhledu na jeho systematickou pozici a taxonomii a zdá se, že tato problematika stále není dořešená. Dnes se řadí mezi pravé houby (Fungi), někdy se také diskutuje, že je to sesterská skupina hub (Vossbrinck a Debruner-Vossbrinck, 2005; Keeling, 2014). Ukázalo se, že mikrosporidie disponují pozoruhodnou plasticitou, co se týče morfologie některých jejich životních stádií. Bohužel právě na těchto znacích bylo založeno jejich řazení (Stentiford a kol., 2013).

Rod *Thelohania* zahrnuje kromě *T. contejeani* další parazity sladkovodních korýšů (*T. parastaci*, *T. montirivulorum*), mořských korýšů (*T. butleri*), ale také hmyzu (*T. pristiphorae*), hlístic (*T. reniformis*) a dokonce obratlovců (*T. apodemi*) (Moodie a kol., 2003a, 2003b; Bakowski a kol., 2014; Bjorson a Oi, 2014; Snowden, 2014; Stentiford a Dunn, 2014).

Ve fylogenetických analýzách vycházejících ze sekvencí genů pro malou ribozomální podjednotku (SSU rDNA) se rod *Thelohania* jeví jako polyfyletický (Brown a Adamson, 2006). Zdá se tedy, že *T. contejeani* je velmi blízce příbuzná s *T. montirivulorum* a *T. parastaci*, jež také napadají sladkovodní raky, ale parazit mořských korýšů *T. butleri* jim je pravděpodobně vzdálený. Přesná taxonomická pozice této trojice parazitů napadajících

sladkovodní raky je však stále nejasná (Brown a Adamson, 2006; Stentiford a kol., 2010; Stentiford a Dunn, 2014).

3. Příznaky infekce a vliv na nakažené raky

Rak nakažený mikrosporidii *T. contejeani* zpočátku nevykazuje jakékoli viditelné příznaky. Jak dlouho po proniknutí parazita do těla se nákaza u raka začne vizuálně projevovat, není přesně známo, protože se v žádné z dosavadních studií nepodařilo sledovat vývoj *T. contejeani* v hostiteli od prvotní infekce až po první vizuální projev nákazy. Nejblíže tomu byl Mažylis (1978), který udává dobu pět až šest měsíců, jeho studie však byla zpochybněna (viz kap. 5.1.1) (France a Graham, 1986).

Pokročilejší fáze infekce se vyznačuje bělavou až opaleskující barvou abdominálního svalstva, jež je vidět přes kutikulu na spodní straně zadečku (obr. 1) (Henneguy a Thélohan, 1892). Stejný vzhled má po rozpitvání raka i napadené svalstvo v jiných částech těla (Quilter, 1976). Bělavé zbarvení je způsobeno velkým množstvím spor, jež zcela vyplňují některá svalová vlákna. Tato fáze infekce se právě kvůli zbarvení svalstva nazývá porcelánová nemoc. Doba od prvních viditelných příznaků nemoci do úhynu nakaženého raka se odhaduje na jeden až dva roky. Může se ale lišit, zřejmě v závislosti na vnějších podmínkách (viz kap. 6) (Mažylis, 1978; Diéguez-Uribeondo a kol., 2006; Imhoff a kol., 2009).



Obrázek 1

Vzhled spodní strany těla raka druhu *Austropotamobius pallipes* nakaženého porcelánovou nemocí (vlevo) a zdravého (vpravo) (převzato z práce Imhoff a kol., 2009)

3.1 Vliv infekce na pohyblivost raků

Ohledně vlivu porcelánové nemoci na pohyblivost raků se odborná literatura příliš neshoduje. Většina prací zabývajících se problematikou porcelánové nemoci popisuje nemocné raky jako netečné, s pomalejšími reakcemi a s neúčinným švihem zadečku při únikové reakci (Cossins a Bowler, 1974; McGriff a Modin, 1983; Skurdal a kol., 1990). Tyto údaje jsou založeny jen na osobním pozorování a chybějí k nim bližší data. Je možné, že se jednalo o raky v závěrečné fázi nemoci.

Experimenty zaměřené na změny v chování nakažených raků ale žádný signifikantní vztah nepotvrdily a jejich výsledkem je, že porcelánová nemoc rychlost a míru pohybu, ani počet švihů zadečkem, dokud se rak nevyčerpá, neovlivňuje (Quilter, 1976; Imhoff a kol., 2009; Rosewarne a kol., 2014). Zároveň však tito autoři popisují švih zadečku jako slabší než u zdravých jedinců.

Další práce se zabývala vlivem porcelánové nemoci na predační chování raků a ukázala, že viditelně nakažení raci druhu *A. pallipes* mají až o 30 % nižší příjem potravy a až o 30 % delší dobu potřebnou na zpracování kořisti (Haddaway a kol., 2012). Autoři nehledě na výsledky Quiltera (1976) a Imhoff a kol. (2009) diskutují, že je zhoršení predačních schopností raka pravděpodobně způsobeno právě sníženou pohyblivostí důsledkem porcelánové nemoci.

Ačkoli tedy většina pokusů vliv porcelánové nemoci na pohyblivost raků nepotvrdila, většina autorů konstatuje, že nemocní raci sníženou pohyblivost mají.

3.2 Vliv na růst, rozmnožování a chování raka

Ani *P. leniusculus*, ani *A. pallipes* nevykazují žádné odlišnosti v růstu těla zdravých raků a raků infikovaných *T. contejeani* bez viditelných příznaků (Imhoff a kol., 2009). Nicméně *A. pallipes* se symptomy porcelánové nemoci rostli pomaleji, obzvlášť jednalo-li se o nerozmnožující se samice (Brewis a Bowler, 1982). Jiné druhy raků v tomto ohledu studovány nebyly.

Vliv porcelánové nemoci na rozmnožovací aktivity raků byl dosud studován pouze u dvou druhů, pro které byly získány rozdílné výsledky. V případě *A. pallipes* gonády nemocných raků neenesly žádné viditelné známky poškození (Cossins a Bowler, 1974). Infikovaní jedinci jsou schopni se pářit a úspěšně rozmnožovat. Nakažení samci i samice byli nalezeni na podzim se zbytky spermatoforu na jejich gonopodech či spodní straně těla. Také byly pozorovány nakažené samice s na první pohled obvyklým množstvím vajíček a čerstvě

vylíhnutých mlád'at. V laboratorních podmínkách se pak samice dokázaly o mlád'ata postarat až do fáze jejich osamostatnění (Imhoff a kol., 2009). Na rozdíl od toho však práce, která se věnovala pokusům s *A. astacus* ukázala, že samice s porcelánovou nemocí nebyly schopné naklást vajíčka a pitva 27 samic odhalila, že se ve vaječnících nenacházely žádné oocyty (Mažylis, 1978). Není ale jasné, jestli důvodem byla opravdu infekce porcelánovou nemocí. Práce věnující se dalším druhům raků tuto problematiku nerozebírají.

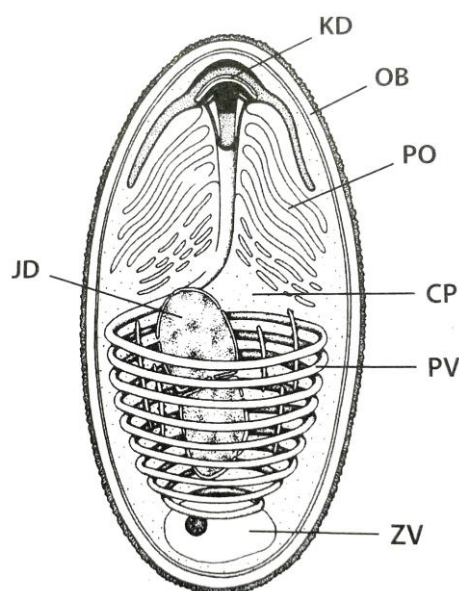
Nepotvrdilo se, že by porcelánová nemoc ovlivňovala u raků upřednostňování světlého nebo temného prostředí (Imhoff a kol., 2009), ani že by měla vliv na rychlost metabolismu raků (spotřebu kyslíku v klidovém stavu) (Rosewarne a kol., 2014).

4. Životní cyklus *T. contejeani*

Životní cyklus mikrosporidií, a tedy i původce porcelánové nemoci, se skládá ze tří fází: infekční fáze (spora), proliferace (merogonie) a tvorby spor (sporogonie). Merogonie a sporogonie jsou vázány na buňky hostitele, naopak spory se mohou vyskytovat i volně v prostředí (Cali a Takvorian, 2014).

4.1 Infekční fáze

Stadiem sloužícím k šíření infekce je u *T. contejeani* nepohyblivá spora oválného tvaru (France a Graham, 1986). Má pevnou nepropustnou stěnu z chitinu. Velký podíl zadní části spory zabírá vakuola. Strukturu spory mikrosporidií ukazuje obr. 2.



Obrázek 2

Schéma struktury spory mikrosporidií (převzato z práce Čepička a kol., 2007): OB – silný několikavrstevný obal, PV – pólóvé vlákno (funguje jako trubice) a jeho kotvicí disk (KD), JD – jádro, CP – cytoplazma, PO – přední membranózní bobtnací těleso, polaroplast, ZV – zadní bobtnací vakuola

Přenos mezi raky je nejspíš přímý a to jak pozřením infikovaného masa (u raků se běžně vyskytuje kanibalismus), tak přenosem spor vodou, do které se uvolní po smrti hostitele při rozkladu těla. Domněnky o přenosu pomocí mezipřenositele nebyly potvrzeny (viz kap 5.1.2).

Branou pro infekci je trávicí trakt. Za působení trávicích enzymů hostitele se vysune duté pólové vlákno, které za pomoci bobtnacích těles umožní invazi sporoplazmy do hemolymfy přes stěnu středního střeva, které není kryté kutikulou (Cossins, 1973; Cali a Takvorian, 2014). Améboidní sporoplazma je pak hemolymfou dopravena k cílové tkáni, do které pronikne a zahájí další fázi vývoje (Cossins, 1973; France a Graham, 1986). Projevy nákazy *T. contejeani* jsou nejvýraznější v zadečkovém svalu, nicméně byla nalezena i v jiných tkáních. Jednalo se například o svalovinu dalších částí těla (oční stopky, trávicího traktu, končetin, srdeční), cerebrální ganglion, nefrocyty, antenální žlázy, vaječníky nebo vyvíjející se vajíčka (Cossins, 1973; Vey a Vago, 1973; Cossins a Bowler, 1974; Voronin, 1971, podle Cossins a Bowler, 1974; Quaglio a kol., 2011; Longshaw a kol., 2012).

Zralé spory byly také nacházeny v hemolymfě. Předpokládá se, že do ní byly uvolněny poté, co některá svalová buňka plná spor praskla. Tyto spory mohou sloužit k infekci dalších tkání v těle raka (Cossins a Bowler, 1974; Oidtmann a kol., 1996).

Napadená tkáň nevykazuje žádnou funkční imunitní reakci (Longshaw, 2012; Oidtmann a kol., 1996). Výjimečně byla pozorována reakce ve formě melaninových infiltrací v napadeném svalovém vláknu, která byla spojována s infekcí *T. contejeani* (Quaglio a kol., 2011).

Spory zůstávají v těle raka, dokud není infikovaná svalová hmota pozřena dalším hostitelem nebo nedojde k rozkladu těla po úhynu raka, kdy se spory postupně uvolňují do prostředí (Cossins a Bowler, 1974). Spory bývají velmi odolné proti nepříznivým vnějším vlivům a vydrží ve vodě infekční i mnoho měsíců (Diéguez-Urbeondo a kol., 2006).

4.2 Merogonie

Merogonie probíhá uvnitř napadené buňky. Meronti, tenkostěnné dělivé buňky se dvěma trvale sdruženými jádry, jež dohromady tvoří diplokaryon, jsou v tomto stádiu v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitele a využívají zdroje buňky. Nepohlavně se dělí, čímž zajišťují namnožení parazita v napadené buňce (Diéguez-Urbeondo a kol., 2006).

4.3 Sporogonie

U *T. contejeani* byly popsány dvě různé cesty sporogonie, které probíhají simultánně. Při každé se tvoří jiný druh elipsoidních spor (Lom a kol., 2001). Zůstává otázkou, jestli oba vznikající druhy spor jsou při uvolnění pro raky infekční (jeden by mohl být například určen k proniknutí do mezipřijímatel, pokud takový článek v životním cyklu *T. contejeani* figuruje).

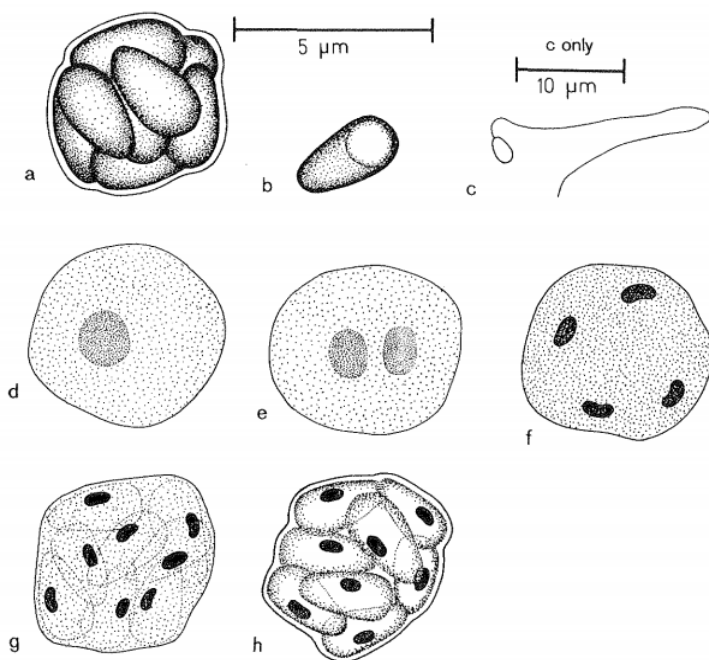
U některých jiných druhů mikrosporidií byla pozorována první generace spor, které byly tenkostěnné a od zbytku spor odlišné. Ty sloužily k šíření infekce uvnitř hostitele (Iwano a Kurtti, 1995). Není jasné, jestli se takové spory vyskytují i u *T. contejeani*, případně zda produkty některého typu sporogonie nejsou vyhrazeny pro tento účel.

4.3.1 První typ sporogonie

Při prvním typu sporogonie pokračuje vývoj parazita transformací merontů na diplokaryotické sporonty, přičemž se od membrány separuje sporoforní měchýřek (SPV). Sporonti jsou pak ohraničeni plazmalemou, mezi níž a SPV je téměř prázdný prostor. Cytoplasma v této fázi obsahuje velké množství hrubého endoplazmatického retikula a váčků. Jádro má laločnatý tvar s hustými strukturami, jež mohou být považovány za chromozomy. Následně se diplokaryon rozdělí na dvě oddělená jádra. V úvodní fázi tohoto typu sporogonie je předpokládán průběh meiózy, nicméně toto nebylo jednoznačně potvrzeno (Lom a kol., 2001). Sporont se rozdělí uvnitř SPV na osm sporoblastů, které se postupně vyvinou v osm jednojaderných spor. Následně proběhne dozrání struktur spory (Lom a kol., 2001). Zralé jednojaderné spory mají průměrné rozměry 4,2 x 2,1 μm a 9 - 10 otáček pólového vlákna a zůstávají uzavřené v SPV spolu s oddělenými válečkovitými útvary a zbytky granulí - pozůstatky procesu vývoje spor (Cossins a Brown, 1974; Lom a kol., 2001).

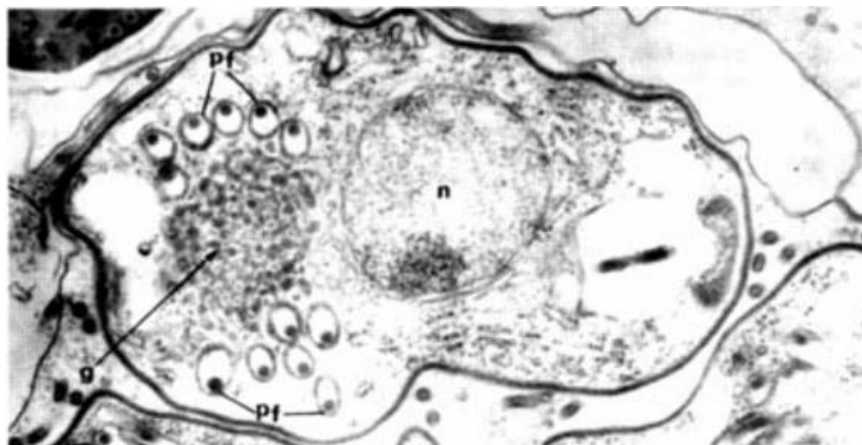
Počet spor uvnitř SPV bývá pro jednotlivé rody mikrosporidií daný, například rod *Thelohania* mívá v jednom SPV osm spor (Kudo, 1924), nicméně se mohou vyskytovat výjimky. Například u *T. contejeani* nalezené v Itálii u *A. pallipes* byly popisovány SPV s různými počty (8 a méně) zrajících spor (Quaglio, 2011). Zda se jednalo o chybnou identifikaci nebo o špatné popsání počtu spor, není jasné.

Jednotlivá vývojová stadia *T. contejeani* procházející prvním typem sporogonie popisuje obr. 3.



Obrázek 3

Vývojová stádia (sporogonie 1. typu) *Thelohania contejeani* z *Paranephrops zealandicus* z Leith Stream, Dunedin na Novém Zélandu (převzato z práce Quilter, 1976) (a-c z čerstvých stěrových preparátů, d-h Giemsa barvení, 10µm měřítko se vztahuje pouze k obrázku c): (a) zralý pansporoblast; (b) spora při silném prosvícení; (c) spora s vysunutým pólovým vláknem; (d, e) jedno a dvoujaderný meront; (f, g) čtyř a osmijaderný sporont; (h) nezralý pansporoblast



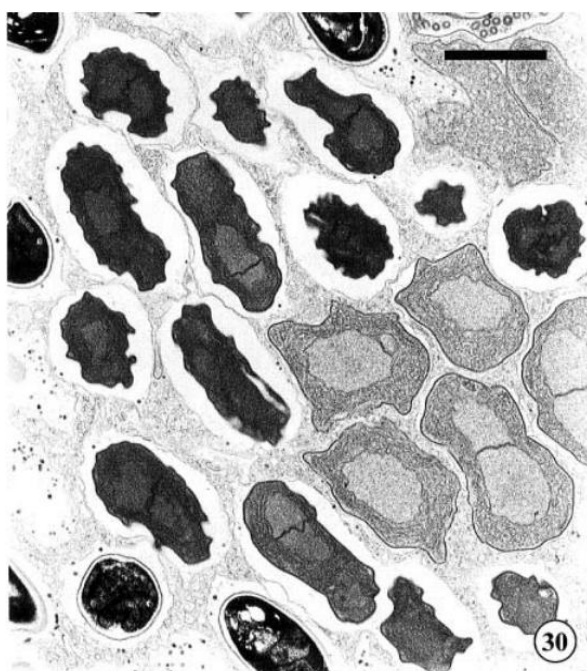
Obrázek 4

Celkový vzhled sporoblastu. Zda se jedná o první či druhý typ sporogonie není jisté, v době pořízení snímku ještě nebyla dvojitá sporogonie *T. contejeani* objevena. Počet otáček pólového vlákna naznačuje druhý typ. Elektronový mikroskop, zvětšeno 24000x. (převzato z práce Vey a Vago, 1973) g – Golgiho aparát; n – jádro; p.f – nové pólové vlákno

4.3.2 Druhý typ sporogonie

Druhý typ sporogonie (diplokaryotická sporogonie) začíná také přetvořením merontů na diplokaryotické sporonty. Od prvního typu sporogonie se liší tím, že se při ní nemění počet jader a nevzniká žádný SPV. Sporonti ze svého povrchu oddělují váčky. V dalším kroku

vývoje tyto váčky splynou a kolem povrchu sporontu vytvoří nový tenký obal. Diplokaryotičtí sporonti se mohou uvnitř tohoto obalu dále dělit. Někdy dochází nejdříve k dělení jader a teprve poté se mnohojaderná buňka rozdělí na jednotlivé sporoblasty. Každý sporoblast nepravidelného tvaru je izolovaný v útvaru podobném vakuole (tento útvar je dobře viditelný na obr. 5). Sporoblasty mají homogenní cytoplasmu s menším množstvím endoplazmatického retikula a s malými váčky připomínajícími primitivní Golgiho aparát. Následně začínají být viditelné další tvořící se struktury - pólové vlákno a vytlačovací aparát. Celkový vzhled sporoblastu ukazuje obr. 4. V závěru sporogonie se tyto buňky přemění na stále diplokaryotické spory s průměrnými rozměry 3,8 x 1,8 μm a s 5 - 7 otáčkami pólového vlákna (Lom a kol., 2001).



Obrázek 5

Sporoblasty druhého typu sporogonie zrající ve spory ve svých oddělených obalech. Vpravo skupina diplokaryotických sporontů. (foto I. Dyková, převzato z práce Diéguez-Urbeondo a kol., 2006)

5. Přenos *T. contejeani*

Paraziti se mohou mezi hostiteli přenášet horizontálně nebo vertikálně. Horizontálním přenosem rozumíme přenos z jednoho jedince na druhého, který nemusí být příbuzný. Vertikálním přenosem je myšleno předání infekce z matky na potomstvo.

5.1. Horizontální přenos

K horizontálnímu přenosu může v případě korýšů a mikrosporidií dojít několika různými způsoby. Hostitel se může nakazit od jiného konzumací infikované části jeho těla. Spory se také mohou z nakaženého jedince uvolňovat do vody a mohou do těla proniknout

přímo s ní, případně spolu s kontaminovanou potravou. V procesu nákazy může figurovat mezihostitel, kterého může definitivní hostitel například pozřít a tak se nakazit. Do hostitele také mohou proniknout spory, které byly zaktivované průchodem přes organismus jiného živočicha. Zda se těmito způsoby přenáší *T. contejeani* mezi raky, rozebírají následující podkapitoly.

5.1.1. Přímý přenos spor

Dosavadní pokusy o horizontální přenos *T. contejeani* přinášely rozdílné výsledky. První, zdánlivě úspěšné pokusy o přenos porcelánové nemoci prostřednictvím kanibalismu u *A. astacus* provedli Voronin (1971, podle France a Graham, 1986) a Mažylis (1978). Krmili pokusné jedince nakaženým račím masem a injekčně aplikovali směs připravenou z nakažené svaloviny do těla raků. Nicméně jejich práce byla kritizována s tím, že infikovaní raci nejspíš nesli nákazu ještě před začátkem pokusu, protože je nepravděpodobné, že by se infekce *T. contejeani* za tak krátkou dobu (Mažylis 5-6 měsíců, Voronin 15 dní) rozvinula do takové míry, jakou popisují. Zmíněnou práci Voronina bohužel nemám k dispozici, abych posoudila detaily metodiky pokusů, čerpám z práce France a Grahama (1986), kde jsou předchozí pokusy diskutovány.

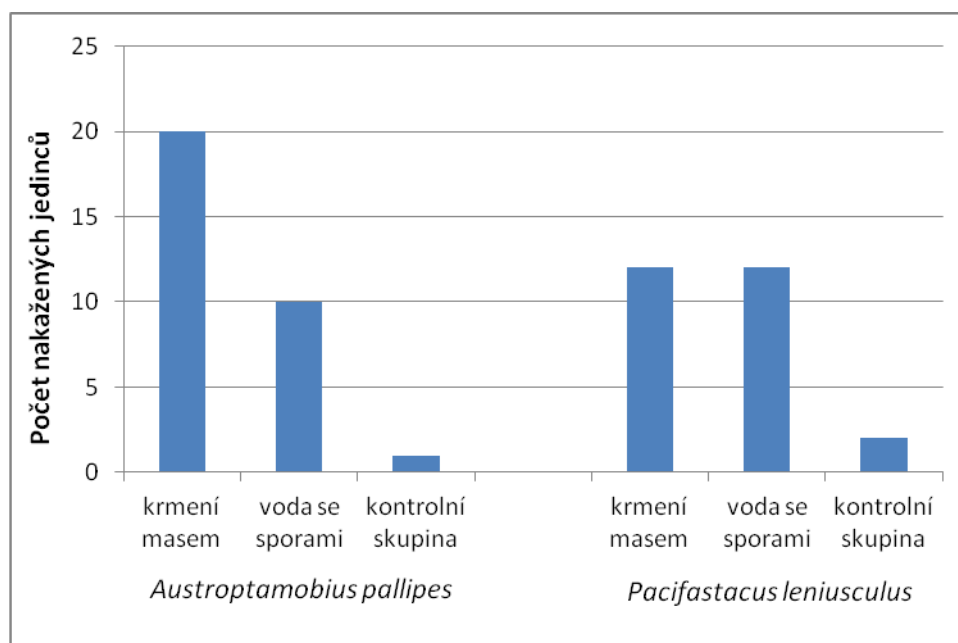
France a Graham navázali na řešení této problematiky vlastními pokusy se severoamerickými raky *Orconectes virilis*. Jejich práce se skládala z několika dílčích experimentů zahrnujících krmení pokusných jedinců nakaženým masem nebo injekce směsí obsahující spory parazita do žaludku raků. Po uplynutí devíti měsíců od začátku pokusu byli raci pitváni, ale ani u jednoho nebyly objeveny známky infekce (France a Graham, 1986).

Další pokusy provedené Fischerem (1992) a Hoffmanem (1999) využívající obdobné metody taktéž nepotvrdily přenos nákazy. Tyto práce také nemám k dispozici, jejich výsledky popisuje Imhoff a kol. (2012).

Všechny zmíněné experimenty (kromě prací Imhoff a kol., 2012 a Bojko, 2013) byly však zásadně limitovány dostupnými metodami detekce parazita v těle raka. Autoři prací museli spoléhat v tomto ohledu na vizuální vyšetření raků a mikroskopickou detekci parazita. Takové metody mohou snadno pominout slabou nákazu, kdy rak nevykazuje příznaky porcelánové nemoci. Tyto symptomy se nemusí projevovat celé měsíce po infekci raka (Imhoff a kol., 2010; France a Graham, 1986).

Situace se změnila s vyvinutím molekulárních metod pro detekci *T. contejeani* (El-Matbouli a Soliman, 2006). Imhoff a kol. provedli v roce 2012 další experiment

využívající už detekci pomocí *nested PCR* a ten změnil náhled na problematiku přenosu *T. contejeani*. Pokusy byly prováděny na racích druhů *A. pallipes* a *P. leniusculus*. Při prvním experimentu krmili pokusné raky infikovaným masem raků druhu *A. pallipes*. V druhém experimentu pak raky vystavovali vodě obsahující spory *T. contejeani*. Celý experiment trval 26 týdnů, na konci byl proveden screening náhodně vybraných jedinců. Žádný z nich nevykazoval vizuální příznaky porcelánové nemoci, ale molekulární metody infekci odhalily. Pro vyšetření byl každému rakovi odebrán vzorek zadečkové svaloviny, přičemž se dbalo na to, aby nedošlo ke kontaktu s trávicím traktem nebo s kutikulou, čímž by mohlo dojít ke kontaminaci sporami z prostředí, které prošly do trávicího traktu, nebo se zachytily na povrchu raka. Jak je vidět na obr. 6, v případě *P. leniusculus* byl jak mezi raky krmenými infikovaným masem, tak mezi těmi, kteří byli vystaveni infikované vodě, mnohem větší podíl nakažených jedinců, než tomu bylo v kontrolní skupině. Podobné výsledky byly zaznamenány i pro *A. pallipes*, u něhož navíc závisel počet nakažených raků na tom, jakou metodou byli infikováni. To by mohlo naznačovat, že je tento druh k infekci konzumací masa nakaženého raka náchylnější (Imhoff a kol., 2012).



Obrázek 6

Graf shrnuje výsledky pokusu o přenos spor vodou a pozřením infikované svaloviny. V každé skupině je uveden počet raků, u kterých byla na konci pokusu pomocí PCR zjištěna DNA *T. contejeani*. (Celkový počet testovaných raků v každé skupině byl 24.) (převzato a upraveno z práce Imhoff a kol., 2012). krmení masem – zvířata byla krmena infikovanou svalovou tkání raků *A. pallipes*. voda se sporami – zvířata byla vystavena vodě z nádrží s infikovanými *A. pallipes*. kontrolní skupina – zvířata byla chována a vyšetřena stejně jako ostatní skupiny, ale nebyla nijak vystavována infekci.

Uvedené výsledky naznačují, že je možný mezidruhový přenos z *A. pallipes* na *P. leniusculus*. Lze z nich vyvozovat, že *T. contejeani* se může přenášet pomocí

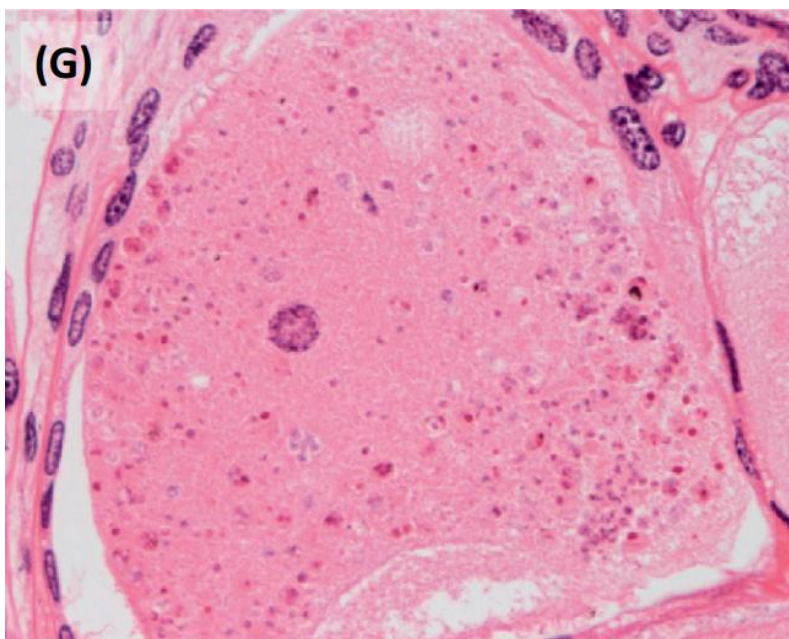
kanibalismu mezi hostiteli. Také může docházet k prostému přenosu spor vodou (Imhoff a kol., 2012). To je závažné zjištění, jelikož spory jsou odolné a vydrží ve vodě infekční i mnoho měsíců (Diéguez-Uribeondo a kol, 2006).

5.1.2. Nepřímý přenos spor

Přítomnost mezihostitele v životním cyklu *T. contejeani* nebyla zjištěna, ani se na toto téma žádná studie přímo nezaměřila. Byla však zkoumána myšlenka aktivace spor průchodem trávicího traktu jiného organismu, která má u *T. contejeani* své opodstatnění. Například *Thelohania penaei* infikovala při pokusech svého hostitele *Penaeus duorarum* (kreveta) pouze poté, co prošla trávicím traktem *Cynoscion nebulosus* (ryba, predátor krevet) (Iversen a Kelly, 1976, podle Herbert, 1988). Další z pokusů France a Grahama (1986) se severoamerickými raky *Orconectes virilis* se zabýval touto problematikou. Při experimentu použili jako průchozí organismus sladkovodního plže *Helisoma anceps*. Po uplynutí devíti měsíců od začátku pokusu byli raci pitváni, ale ani u jednoho nebyly objeveny známky infekce (France a Graham, 1986). Neúspěch mohl být způsoben i tím, že plž byl rozřezán a podán ke konzumaci rakům již hodinu poté, co pozřel infikované maso, což nemuselo být dost dlouho na to, aby proběhla aktivace spor potřebná pro infekci raka.

5.2. Vertikální přenos

Vertikálním přenosem *T. contejeani* z matky na potomstvo se zabývali jen Imhoff a kol. (2009) a to pouze okrajově. Během své práce provedli molekulární screening několika vizuálně zdravých samic *A. pallipes*, který potvrdil nákazu *T. contejeani*, ale v jejich vajíčkách a u vylíhnutých mláďat nebyla DNA parazita zjištěna. Předpokládají tedy, že k vertikálnímu přenosu nedochází nebo dochází jen zřídka. Sami však namítají, že zkoumaný vzorek jedinců byl velmi malý a výsledky tudíž nejsou směrodatné. Také je možné, že nákaza u mláďat nebyla ještě natolik rozvinutá, aby byla detekovatelná těmito metodami. Navzdory názoru, že vertikální přenos u *T. contejeani* neprobíhá, byly nalezeny raci oocyty napadené tímto parazitem (obr. 7) (Stentiford a Dunn, 2014). Nicméně přítomnost *T. contejeani* v oocytech nemusí nutně znamenat, že se na potomstvo přenesou.



Obrázek 7

T. contejeani v račím oocytu. Barveno hematoxylinem a eosinem. (převzato z práce Stentiford a kol., 2013)

6. Faktory ovlivňující rozvoj porcelánové nemoci a prevalenci nákazy

Tato kapitola se věnuje faktorům, které mohou mít vliv jak na rozvoj nákazy v těle raka, tak na šíření infekce *T. contejeani* v populaci hostitelů. Vzhledem k tomu, že pouze několik studií z posledních let využívá molekulární metody, je mnohdy obtížné tyto dvě věci odlišit, protože při vizuální kontrole není jasné, kolik raků nese nákazu *T. contejeani* bez příznaků.

6.1 Druh hostitele

Porcelánová nemoc postihuje široké druhové spektrum raků (viz kap. 7), míra jejího projevu by se však mohla mezi druhy lišit. V dostupných pracích na toto téma ale tento fenomén nebyl dostatečně podložen. V britských populacích byli nalezeni *P. leniusculus* s bílou svalovinou zadečku, která si na rozdíl od nemocných *A. pallipes* stále zachovávala určitou průhlednost (Imhoff a kol., 2009). Imhoff a kol. (2011) také zaznamenali, že *P. leniusculus* málokdy nese příznaky nemoci a to se týká i populací, kde prevalence zjištěná molekulárními metodami byla i 12,3 %. Nicméně přestože tito autoři navrhuji, že je *P. leniusculus* schopen za obvyklých podmínek odolávat rozvoji infekce v těle či ji alespoň mírnit, z dat, která prezentují, to tak jednoznačně nevyplývá. Velmi podobné výsledky získali totiž i pro *A. pallipes* (*P. leniusculus* 12,3 %, *A. pallipes* 14 %, oba druhy bez příznaků). Výzkum obou druhů se výrazně lišil v počtu vzorků (2399 zkoumaných jedinců *P. leniusculus*, 21 zkoumaných jedinců *A. pallipes*). Vyvozovat závěry z těchto výsledků by

bylo předčasné, pro spolehlivé porovnání míry projevu porcelánové nemoci těchto dvou, ale i dalších druhů raků, je zapotřebí podrobnější studie.

6.2 Pohlaví a věk raků

Příznaky rozvinuté infekce *T. contejeani* se vyskytují jak u samců, tak u samic a dokonce i u mláďat vylíhnutých v dané sezóně (Imhoff a kol., 2009). U *Paranephrops zealandicus* byly příznaky nemoci pozorovány spíše u samic než u samců (13 samic a 6 samců) (Quilter, 1976). Tento jev však nebyl zkoumán molekulárními metodami a není tedy jasné, jestli jsou samice náchylnější k infekci parazitem nebo k rozvinutí porcelánové nemoci v těle. Autor také neuvádí poměr pohlaví ve studovaném vzorku a je tedy možné, že vyšší počet nakažených samic mohl reflektovat jen vyšší počet samic v populaci. V případě *A. pallipes* bylo molekulárními metodami zjištěno, že samice mají větší pravděpodobnost nákazy *T. contejeani* (Imhoff a kol., 2012) než samci. U *P. leniusculus* nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl mezi pohlavími (Dunn a kol., 2009; Imhoff a kol., 2012).

6.3 Vlastnosti populace

Dalo by se očekávat, že se paraziti budou více šířit v populacích hostitelů o vyšších hustotách, protože dochází k častějším kontaktům mezi hostiteli (Arneberg a kol., 1998). Jelikož se porcelánová nemoc přenáší i pozřením infikovaného masa (Imhoff a kol., 2012), dá se předpokládat, že její šíření v populaci bude závislé navíc na míře kanibalismu v populaci (Cossins, 1973). Nicméně závislost míry nákazy v populaci na hustotě populace nebo míře kanibalismu nebyla dosud prokázána (Skurdal a kol., 1990).

Vliv na rozvoj infekce mohou mít i genetické predispozice v populaci, nebylo to však zatím zkoumáno (Imhoff a kol., 2009).

6.4 Teplota prostředí

Jeden ze zatím neprokázaných jevů je vliv teploty vody a klimatu na rozvoj nemoci v těle hostitele, případně na rychlost šíření *T. contejeani* v populaci. V populaci v chladném norském jezeře Steinsfjorden byl pozorován nízký podíl nemocných raků (0,05 – 2,11 %), což bylo přisuzováno právě nízkým teplotám (Skurdal a kol., 1990). Avšak podobně nízká procenta nemocných jedinců byla zjištěna i u italských (0,17 – 3,7 %) a španělských populací (0,1 – 1,0 %), což spíše naznačuje, že teplota prostředí šíření *T. contejeani* nebo rozvoj nákazy zásadně neovlivňuje (Mori a Salvidio, 2000; Diéguez-Uribeondo a kol., 1997).

6.5 Ekdyse

V několika případech bylo pozorováno, že svlékání raka umožnilo rozpoznat projevy porcelánové nemoci – zviditelnil se bělavý vzhled zadečku (Brown a Bowler, 1977; Imhoff a kol., 2009). Imhoff a kol. (2009) diskutuje vysvětlení, že proces svlékání může navodit urychlení rozmnožování parazita či uvolnění spor, a tím zrychlit i postup infekce. Nicméně je možné, že nová kutikula je jen průhlednější a projevy nemoci jsou tudíž viditelnější.

6.6 Stres

Dalším předpokládaným faktorem ovlivňujícím, jak rychle se nemoc u raka rozvine a jak se rozšíří v populaci, může být náhlá stresová situace vyvolaná například změnou prostředí (Imhoff a kol., 2009). V případě, kdy se uměle snížilo pH pokusného jezera, zvýšil se v následujícím roce počet raků s příznaky porcelánové nemoci z 1,7 % na 6,5 % (v dalším roce dokonce na 7,7 %). Není však jasné, jestli kyselé prostředí zvýšilo míru kanibalismu v populaci, jestli je nižší pH příznivější pro rozvoj infekce *T. contejeani* nebo jestli stres jen snížil odolnost raků (France and Graham, 1985). Mezi další stresové faktory mohou patřit například znečištění vody, nedostatek vhodných úkrytů, změna charakteru toku (např. při přehrazení). Vliv těchto faktorů však dosud nebyl studován.

7. Výskyt a prevalence *T. contejeani*

T. contejeani napadá široké spektrum druhů raků. Vyskytla se myšlenka, že by se mohla v prostředí vyskytovat kromě raků i v alternativních hostitelích. Z toho důvodu byli pomocí PCR testováni blešivci *Gammarus pulex* a *Crangonyx* sp., ale ani u jednoho nebyla infekce potvrzena (Bojko, 2013).

Nákaza *T. contejeani* byla zjištěna v Evropě a v Rusku, ale i v Austrálii, na Novém Zélandu a v Severní Americe. Záznamy, které se mi o výskytu *T. contejeani* podařilo najít v odborné literatuře, shrnuji v tab. 1.

Data o výskytu a prevalenci *T. contejeani* však mohou být zkreslená kvůli nedostatkům použitých metod. Většina údajů o prevalenci *T. contejeani* byla získána dle počtu raků s viditelnými příznaky porcelánové nemoci. Toto zhodnocení bylo většinou doplněno mikroskopickým ověřením, že se jedná právě o *T. contejeani*. Data vycházející z takového postupu ale nelze srovnávat s těmi, která vyplývají z výzkumu používajícího molekulární metody, protože ty mohou detekovat infekci ještě předtím, než dojde k vizuálním projevům (Imhoff a kol., 2011). Metody založené na analýze DNA byly zatím použity pouze ve Velké Británii u druhů *A. pallipes* a *P. leniusculus*, kde byla zjištěna prevalence nákazy 14 % a

12,3 % navzdory tomu, že žádný ze studovaných raků nenesl příznaky porcelánové nemoci (Imhoff a kol., 2011).

Problémem může být kromě podhodnocení získaných dat i vlastní identifikace *T. contejeani* a záměna tohoto druhu s jinými druhy mikrosporidií. S ohledem na nepřiliš přesná kritéria dříve používaná pro identifikaci *T. contejeani* – bělavý zadeček raka, počet spor v pansporoblastu, rozměry spor (Quilter, 1976; Jones, 1980; McGriff a Modin, 1983) je třeba brát záznamy nepodložené molekulárními metodami s rezervou. Zatím v literatuře nebyl molekulárními metodami doložen nález *T. contejeani* mimo Evropu.

V České republice je porcelánová nemoc u raků popisována již v publikaci z první poloviny minulého století (Štěpán, 1932-33). Podle tohoto autora se nejedná o vzácné onemocnění, píše, že jí „mnoho raků propadá“. Krupauer (1968) také popisuje porcelánovou nemoc způsobovanou *T. contejeani*. Ani jeden z těchto autorů nezmiňuje, který druh raka s tímto onemocněním zaznamenali.

Ani soudobé české publikace porcelánovou nemoc neopomíjejí. Štambergová a kol. (2009) zmiňují například nález infikovaného raka (neupřesňují druh) v Křtinském potoce (okres Blansko). Dva viditelně nakažení raci *A. torrentium* byli nalezeni také v horním úseku Kublovského potoka na Křivoklátsku v roce 2011 (A. Pavlíčko, osobní sdělení). Další nemocný rak druhu *A. astacus* byl v roce 2013 odchycen v Pšovce (E. Balcarová, osobní sdělení). Dle osobního sdělení P. Kozáka (2015) je porcelánová nemoc v současnosti v populacích původních raků v ČR poměrně běžná, většinou s prevalencí vizuálně nemocných raků okolo 1 %. Výjimkou byl odlov *A. astacus* ze Zlatého rybníka v Píseckých horách v roce 2014, kde bylo zastoupení jedinců s porcelánovou nemocí výrazně vyšší, což mohlo být způsobeno nepříznivými podmínkami této lokality. Žádný z těchto případů nákazy nebyl ověřen molekulárními metodami.

U několika českých raků druhu *A. astacus* bylo již provedeno i vyšetření pomocí metody PCR a následného osekvenování produktu (Lom a kol., 2001). Stejní autoři měli také významný přínos pro studium *T. contejeani*, když popsali její dimorfní životní cyklus. Na naší katedře se nyní pokoušíme na výzkum porcelánové nemoci navázat. Zatím ještě nebyly naše výsledky potvrzeny sekvenací, ale první data naznačují, že by u nás v laboratoři mohla fungovat metoda detekce *T. contejeani* pomocí PCR (s primery F3/B3). Produkt amplifikace odpovídající svou délkou *T. contejeani* byl získán ze zadečkové svaloviny, uropodů a pereopodů raka *A. astacus* s viditelnými příznaky porcelánové nemoci. Vzorek pocházel pravděpodobně z lokality Kramata na Šumavě.

Tabulka 1

Souhrn dat o výskytu a prevalenci *T. contejeani* u různých druhů raků. Data označená * byla získána pomocí molekulárních metod a zahrnují tedy i infikované jedince bez příznaků porcelánové nemoci. Ostatní hodnoty byly zjištěny pomocí vizuálního zhodnocení, kdy byli zaznamenáni pouze raci v pokročilém stadiu infekce. ? - studie data neuvádí nebo jsou nejasná.

Druh hostitele	Země	Prevalence	Počet zkoumaných populací; počty zkoumaných jedinců ¹	Zdroj
<i>Astacus astacus</i>	Francie Německo Finsko tehdejší SSSR Litva Norsko Norsko Litva ČR	"vysoká" i přes 30 % ? ? 0,7 - 3,7 % 0,4 - 1,5 % 0,05 - 2,11% 0,9 - 1,7 % ?	? ? 6 populací; 6 nakažených jedinců ? ? 7 populací; 140 - 580 1 populace; 260 - 2072 (6 let) ? ?; několik nakažených jedinců	Henneguy a Thélohan, 1892 Schäperclaus, 1954, podle Sumari a Westman, 1969 Sumari a Westman, 1969 Voronin, 1971, podle McGriff a Modin Mažylis 1978 Skurdal a kol., 1988 Skurdal a kol., 1990 Burba a kol., 1996 Lom a kol. 2001
<i>Astacus leptodactylus</i>	Polsko Litva	? ?	? ?; několik nakažených jedinců	Krucinska and Simon, 1968, podle McGriff a Modin, 1982 Mažylis 1978
<i>Austropotamobius pallipes</i>	Francie Velká Británie Španělsko Itálie Itálie Velká Británie Velká Británie	až 10 % 7,3 - 18,2 % ² 0,0 - 1,0 % 0,5 - 0,7 % 0,17 - 3,7 % 0,0 - 4,3 % 14 %* 0 - 13 %	? 1 populace; 501 - 1663 (2 roky) 1 populace; 436 - 2515 (6 let) 2 populace; 217 - 451 21 populací; 5 - 1730 7 populací; 1 - 177 5 lokalit na jedné řece; 21 6 populací; 3 - 30	Vey a Vago, 1973 Brown a Bowler, 1977 Diéguez-Urbeondo a kol., 1997 Mori a Salvidio, 2000 Quaglio a kol., 2011 Imhoff a kol., 2011 Longshaw a kol. 2012
<i>Austropotamobius torrentium</i>	ČR	?	1 populace; 2 nakažení jedinci	A. Pavlíčko ³ , osobní sdělení, 2011
<i>Orconectes limosus</i>	Polsko	?	?	Krucinska and Simon, 1968, podle McGriff a Modin, 1982
<i>Orconectes virilis</i>	Kanada	1,7 - 6,5 % ⁴ 0,0 - 1,5 %	1 populace; 234 - 427 (2 roky) 3 populace; 68 - 262 (2 roky)	France a Graham, 1985
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Kalifornie, USA Velká Británie	? 12,3 %*	1 populace; 3 nakažení jedinci 7 lokalit na jedné řece; 1053	McGriff a Modin, 1983 Imhoff a kol., 2011
<i>Paranephrops planifrons</i>	Nový Zéland	1,8 %	1 populace; 109	Jones, 1980
<i>Paranephrops zealandicus</i>	Nový Zéland	13 % 0 %	1 populace; 255 1 populace; 105	Quilter, 1976

¹ údaje za středníkem uvádějí rozsah počtů raků odchycených během jednotlivých vzorkování, některé populace byly sledovány opakovaně po dobu několika let (údaj v závorce) a některé dokonce víckrát za sezónu. Pokud byli odchytáváni jen jedinci vizuálně nemocní a počty celkově odchycených raků nejsou uvedeny, je to označeno jako počet nakažených jedinců.

² 18,2 % je prevalence v době svlékání, kdy jsou podle autora příznaky viditelnější

³ údaj je zařazen, protože je to jediná zpráva o naze A. *torrentium*, která je mi známa. Ostatní kusé informace o výskytu porcelánové nemoci na území ČR jsou v kap. 8.

⁴ populace byla v prostředí, kde bylo uměle sníženo pH

8. Rizika porcelánové nemoci a opatření proti nim

Porcelánová nemoc bývá považována za druhé nejzávažnější onemocnění raků po račím moru (Alderman a Polglase, 1988, podle Edgerton a kol., 2002). Masové úhyny raků na porcelánovou nemoc nejsou běžný jev, nicméně několik masových úhynů, které se v minulosti v Evropě vyskytly, jsou přisuzovány právě tomuto onemocnění. Jednalo se o úhyny v některých populacích *A. pallipes* a *A. astacus* v Německu a některých francouzských populacích *A. astacus*. Literatura uvádí, že porcelánová nemoc působila v těchto račích populacích několik let značné škody a že pozorovaná prevalence nákazy byla i přes 30 % (Henneguy a Thélohan, 1892; Schäperclaus, 1954, podle Cossins, 1973).

Zvýšení počtu nemocných raků v populaci je samo o sobě závažné kvůli riziku masovějšího úhynu, navíc může indikovat nějakou stresovou událost, která v populaci proběhla nebo stále probíhá (Imhoff a kol., 2009). Zvýšená prevalence má také nežádoucí ekonomické dopady u populací, které bývají pravidelně vylovovány, protože nakažení raci umírají dříve a není možné je prodat (Oidtmann a kol., 1996).

Při nízkých počtech nakažených raků (jednotky procent) nákaza populaci neohrožuje (Diéguez-Uribeondo a kol., 1997). Přesto je doporučováno cenné račí populace pravidelně sledovat a hlídat stav nákazy. Při snaze o potlačení nákazy v populaci se jako jediné opatření uvádí pravidelný odchyt a likvidace viditelně nakažených jedinců (Mažylis, 1978; Skurdal a kol., 1990; Diéguez-Uribeondo a kol., 1997). Pokud je však nákaza stabilně nízká a nemá negativní dopady například na ekonomické využívání populace, není třeba se k těmto postupům uchýlovat.

Při pokusech o opětovné vysazování raků do vod, kde byli dříve vyhubeni (například důsledkem račího moru), je třeba brát ohled na to, aby byli přesouvaní raci zdraví. Bylo by proto vhodné zjišťovat prevalenci nákazy *T. contejeani* u zdrojových populací (Imhoff a kol., 2009; 2011). Vzhledem k inkubační době porcelánové nemoci se před nástupem molekulárních metod doporučovala alespoň půlroční karanténa přesouvaných raků (Mažylis, 1978). Díky molekulárním metodám je dnes možné provést neletální vyšetření například pomocí PCR, které může zjistit infekci *T. contejeani* i u raků bez vizuálních příznaků (Imhoff a kol., 2010). Může se však stát, že ani jedno z těchto opatření není dostupné. V takovém případě nezbývá než se spokojit s odběrem vizuálně zdravých raků z populace s nízkou mírou nákazy (Imhoff a kol., 2012). V případě prevalence nad 20 % (při detekci molekulárními

metodami) se doporučuje vybrat pro vysazování jinou zdrojovou populaci (Imhoff a kol., 2009).

Potenciální riziko představují i další druhy rodu *Thelohania*, například *T. parastaci* nebo *T. montirivulorum*. Jedná se o druhy napadající australské raky *Cherax quadricarinatus* a *Cherax destructor* (Herbert, 1988; Moodie a kol., 2003a, 2003b). Riziko zavlečení těchto parazitů do evropského prostředí je reálné, protože oba račí druhy jsou v Evropě v nabídce akvaristických obchodů a dokonce už existují i množící se populace ve volné přírodě – *C. destructor* v Itálii a zřejmě i ve Španělsku (Scalici a kol., 2009, Kouba a kol., 2014) a *C. quadricarinatus* ve Slovinsku (Jaklič a Vrezec, 2011). Zda jsou *T. parastaci* či *T. montirivulorum* schopné napadat evropské raky, zatím nebylo zjištěno. Může se však stát, že evropské druhy budou vůči těmto parazitům citlivější než původní australští hostitelé, což by v případě zavlečení parazita (například při vypuštění napadeného raka do volné přírody nezodpovědným akvaristou) mohlo mít pro původní evropské raky negativní důsledky (Imhoff a kol., 2009).

9. Metody detekce *T. contejeani*

Pro úspěšný výzkum račích parazitů je nezbytné zvolit vhodné metody jejich detekce. Nevhodná volba metody může vést k nepřesným nebo dokonce chybným výsledkům.

9.1. Vizuální kontrola

Na první pohled viditelný příznak rozvinuté porcelánové nemoci u odchyceného raka je bělavý až opaleskující sval zadečku raka. Tento znak byl v minulosti klíčovým pro detekci *T. contejeani* (Diéguez-Urbeondo a kol., 1997; Skurdal a kol., 1990). Později byla tato metoda doplňována ještě histologickým potvrzením, že se u raků vykazujících bělavé svalstvo skutečně jedná o porcelánovou nemoc. V dnešní době se jedná o metodu vhodnou maximálně pro nastínění situace v populaci, neboť to, že rak bělavý zadeček nemá, ještě neznamená, že nehostí *T. contejeani*. K propuknutí porcelánové nemoci může dojít mnoho měsíců poté, co parazit již pronikl do těla raka (Imhoff a kol., 2012). Zároveň však bělavý zadeček nemusí znamenat, že rak hostí *T. contejeani*, podobné příznaky může mít i nákaza jinými mikrosporidii (Imhoff a kol., 2010).

9.2. Mikroskopické vyšetření

9.2.1. Světelný mikroskop

V histologických preparátech zhotovených z infikovaných račích tkání lze nalézt spory *T. contejeani*. K histologickému vyšetření je nejvhodnější zadečkový sval, spory jsou však pozorovatelné i v dalších tkáních (viz kap. 4.1).

Při pozorování infikovaných tkání pod světelným mikroskopem můžeme vidět převažující volné spory, někdy i spory zapouzdřené po osmi ve SPV (sporoformní měchýřek). Tvar spor je oválný s širším posteriorním koncem a s velkou posteriorní vakuolou sahající někdy až do poloviny délky spory. Dvoujaderné spory *T. contejeani* měří v průměru 3,8 x 1,8 μm . Jednojaderné spory v SPV jsou trochu širší, oválnější, s průměrnými rozměry 4,2 x 2,1 μm (Lom a kol., 2001).

Spory se pod různým barvením jeví různě (Quaglio a kol., 2011):

- Při použití **Hematoxylin-eosinu** se spory v tkáni barví bledě růžově a jsou snadno viditelné ve svalovém vlákně, nikoli však v jiných tkáních.
- Při barvení pomocí **PAS** (Periodic-acid Schiff's stain, česky Schiffovo reagens) jsou spory růžové až průhledné. Zabarvení je slabé a nezřetelné. Někdy je viditelná zadní vakuola.
- Při **Ziehl-Neelsenově barvení** se spory barví fialově nebo růžově, SPV je dobře rozpoznatelný.
- **Giemsa** barví spory do bledě nebo tmavě modré, ale morfologie je nezřetelná. Někteří jedinci *T. contejeani* se vůbec nezbarví. Barvené objekty je těžké rozpoznat od pozadí, protože kontrast je slabý.
- Spory **barvené dle Macchiavella** jsou lehce fialové proti zelenému pozadí, snadno pozorovatelné i při velkém zvětšení.
- Nejlepší výsledky přináší barvení **Crossmanovým trichromem**. Spory jsou sytě oranžové proti modrému pozadí a jsou snadno rozpoznatelné.

9.2.2. Elektronový mikroskop

Transmisní elektronový mikroskop se používá spíše pro podrobnější popsání ultrastruktury jednotlivých vývojových stádií parazita nacházejících se v tkáni hostitele. Nejběžněji pozorovaným stádiem *T. contejeani* jsou zralé spory, především volné, ale i ty uzavřené po osmi v SPV (Lom a kol., 2001).

9.3. Molekulární metody

Na rozdíl od předchozích postupů, molekulární metody neumožňují studovat jakékoli struktury parazita, zato však lze s jejich využitím rychleji a s větší spolehlivostí rozpoznat jeho samotnou přítomnost v testované tkáni hostitele. Za tímto účelem se využívají druhově specifické části genomu *T. contejeani*.

Ani tyto metody nejsou stoprocentně spolehlivé. To, že se s jejich využitím nákaza nepotvrdí, nemusí znamenat, že jedinec infikován není. Infekce mohla postihnout jinou část těla, než kde se nacházela vyšetřovaná tkáň, nebo může být tak slabá, že citlivost molekulárních metod není dostatečná.

9.3.1. Vypreparování a uchování vzorku tkáně

Testovaná tkáň se většinou odebírá ze zadečkového svalu nebo ze svalu končetiny usmrčeného raka. Je vhodné povrch těla v místě odběru tkáně předem očistit, aby nedošlo ke zbytečné kontaminaci vzorku DNA necílových organismů a potenciálními inhibitory PCR, které by mohly být obsaženy na znečištěném povrchu těla raka. Stejně tak je potřeba zbavit případné kontaminace i veškeré nástroje mezi preparacemi jednotlivých vzorků.

U raků, které není vhodné usmrtit, je možné použít neletální metodu odběru vzorků. Při této metodě se živému rakovi osuší zadeček a na spodní straně zadečku se špičkou injekční jehly provede řez dlouhý 2 - 3 mm. Poté se odebere kousek svalové tkáně (asi 1 mm³) a uloží se do mikrozkuhavky s čistým vysoce koncentrovaným ethanolem (obvykle 96 %) nebo se hluboce zamrazí (-80 °C). Zadeček se opět osuší. Při odbírání vzorku z končetinového svalstva se pitevními nůžkami odstříhne jeden pereopod ze čtvrtého páru. Z něj se následně vyjme svalová tkáň a uchovává se stejně (Imhoff a kol., 2010).

9.3.2. Extrakce DNA

Tkáň se v 2ml mikrozkuhavce důkladně homogenizuje. Pokud odebraný vzorek obsahuje i tvrdé části (např. kutikulu) je dobré jej rozdrtit v třecí misce s tloučkem za pomoci tekutého dusíku.

Izolovat DNA lze i ze spor. Testovaná tkáň se rozmačká skalpelem a vzniklá hmota se protlačí přes 10µm filtr, aby se oddělily spory. Ty se několikrát omyjí dvakrát destilovanou vodou a opakovaně se centrifugují při 4000 x g 2 minuty. Následuje jeden z postupů pro izolaci DNA níže.

Postupů pro izolaci DNA při detekci *T. contajeana* je více. Metoda izolace DNA využívající **fenol-chloroform** je zahájena lýzou buněk a natrávením proteinů pomocí lyzačního roztoku¹. Následuje separace DNA od proteinů a dalších příměsí přidáním roztoku fenolu s chloroformem (1:1) (při opakování kroků se používá také samotný fenol a samotný chloroform), kdy se roztok dělí na dvě fáze, mezi nimiž se hromadí proteiny. Horní fáze (vodný roztok DNA) se následně pipetuje do nové mikrozkušavky. Následuje precipitace (vysrážení) DNA za použití ethanolu. Tento postup je levný, nicméně pracný a práce s fenolem a chloroformem je bezpečnostně náročnější, čistota produktu závisí na počtu opakování kroku, při němž se přidává roztok fenolu a chloroformu (Lom a kol., 2001; Kocher a kol., 1989).

Dále je možné použít metodu izolace DNA založenou na použití **Chelexu** (chelatační činidlo, váže kovové ionty). Ke tkáni homogenizované v destilované vodě se přidá proteináza K a Chelex 100 a inkubuje se přes noc při 56 °C. Dále se denaturují proteiny při 100 °C a po centrifugaci se supernatant s DNA přenesou do nové mikrozkušavky. Tento postup je levnější a méně pracný, ale produkt není tak čistý (Bojko, 2013).

Při využití komerčního **izolačního kitu** se vzorek inkubuje přes noc s proteinázou K při 56 °C, centrifuguje se v kolonce za postupného promývání pufrů a následně se DNA uvolní z kolonky do mikrozkušavky v podobě roztoku. Tento postup je dražší a pracnější, ale získaná DNA je poměrně čistá (El-Matbouli a Soliman, 2006).

Po provedení izolace je možné ověřit přítomnost DNA například pomocí spektrofotometrie při absorbanci 260 nm (Bojko, 2013) nebo provedením PCR za použití primerů pro detekci račí DNA (Dunn a kol., 2009; Imhoff a kol., 2010).

9.3.3. *Nested PCR*

Nested PCR je opakovaná polymerázová řetězová reakce (s použitím různých primerových párů) používaná pro zvýšení výtěžku DNA.

Pro první PCR se použijí obecnější primery (např. obecné pro mikrosporidie) a amplifikuje se delší úsek DNA. Jako obecnější primery se ve většině prací zaměřených

¹ Přesné složení roztoku se liší, může být tvořen například NaCl, Tris-HCl, EDTA, SDS a proteinázou K.

na *T. contejeani* používá dvojice obecně mikrosporidiálních primerů V1f/1492r (Lom a kol., 2001; Imhoff a kol., 2010, 2011, 2012; Bojko, 2013). Vznikají při ní méně specifické produkty.

Produkt první PCR se pak využije jako templát pro druhou PCR, kde se používají primery specifické pro *T. contejeani*. V literatuře jsou popsány dvě takovéto kombinace primerů.

El-Matbouli a Soliman (2006) navrhli dvojici primerů F3/B3, které umožňují amplifikaci části jaderného genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rDNA). Produkt PCR při použití těchto primerů má délku 261 párů bází. Tato dvojice primerů pak byla používána i v dalších pracích (Imhoff a kol., 2011, 2012).

Druhá dvojice specifických primerů pro *T. contejeani* je MIC5-1/MIC3-4 (uváděno i jako Mic5/Mic3), produkt PCR při jejich použití je dlouhý 215 párů bází. Tyto primery byly použity v pracích Imhoff a kol. (2010) a Bojko (2013). Autoři první zmiňované práce uvádějí jako zdroj tehdy ještě nevydanou práci El-Matbouli a Soliman (2004), kterou se mi nepodařilo najít (nenašla jsem ani, že by někdy byla vydána). Bojko (2013) pak jako zdroj uvádí práci El-Matbouli a Soliman (2006), která však tyto primery nezmiňuje. Nepodařilo se mi tedy dohledat, kdo tyto primery navrhl, ani další podrobnosti o nich.

Podrobnější postup pro *nested PCR* je popsán v tab. 2.

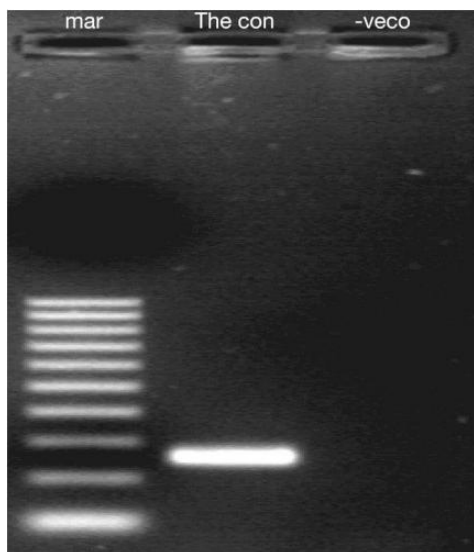
Tabulka 2

Protokol pro provedení *nested PCR*

		1. PCR	2. PCR
Primery		V1f/1492r	F3/B3
Délka fragmentu		1360 bp	261 bp
Reagencie	H ₂ O (μl)	14,6	11,3
	1. primer (0,4 μM) (μl)	0,2	0,1
	2. primer (0,4 μM) (μl)	0,2	0,1
	readymixMM (μl)	25	12,5
	vzorek DNA (μl)	10	1
Celkový objem (μl)		50	25
PCR	Počáteční denaturace	95 °C 5 min	95 °C 5 min
		95 °C 1 min	95 °C 45s
	Vlastní cyklus	50 °C 1 min 10 s (40x)	66 °C 45s (38x)
		72 °C 1 min 30 s	72 °C 45s
Závěrečná elongace		72 °C 10 min	72 °C 5 min

K vizualizaci produktů lze použít elektroforézu na 2% agarózovém gelu při použití TBE pufru a barvení ethidiumbromidem či jiným vhodným barvivem. Po nasvícení UV světlem by

se měl v případě úspěšné amplifikace DNA parazita zobrazit pruh amplifikované DNA příslušné délky, jak je vidět na obr. 8 (El-Matbouli a Soliman, 2006).



Obrázek 8

Agarózový gel ukazující produkt PCR specifické pro *Thelohania contejeani* za použití primerů F3/B3. Výsledkem je 261 bp dlouhý fragment DNA *T. contejeani*, zatímco u negativní kontroly k amplifikaci nedošlo. (převzato z práce El-Matbouli a Soliman, 2006) Sloupce: mar = 100 bp DNA standard; The con = DNA *T. contejeani*; -veco = negativní kontrola

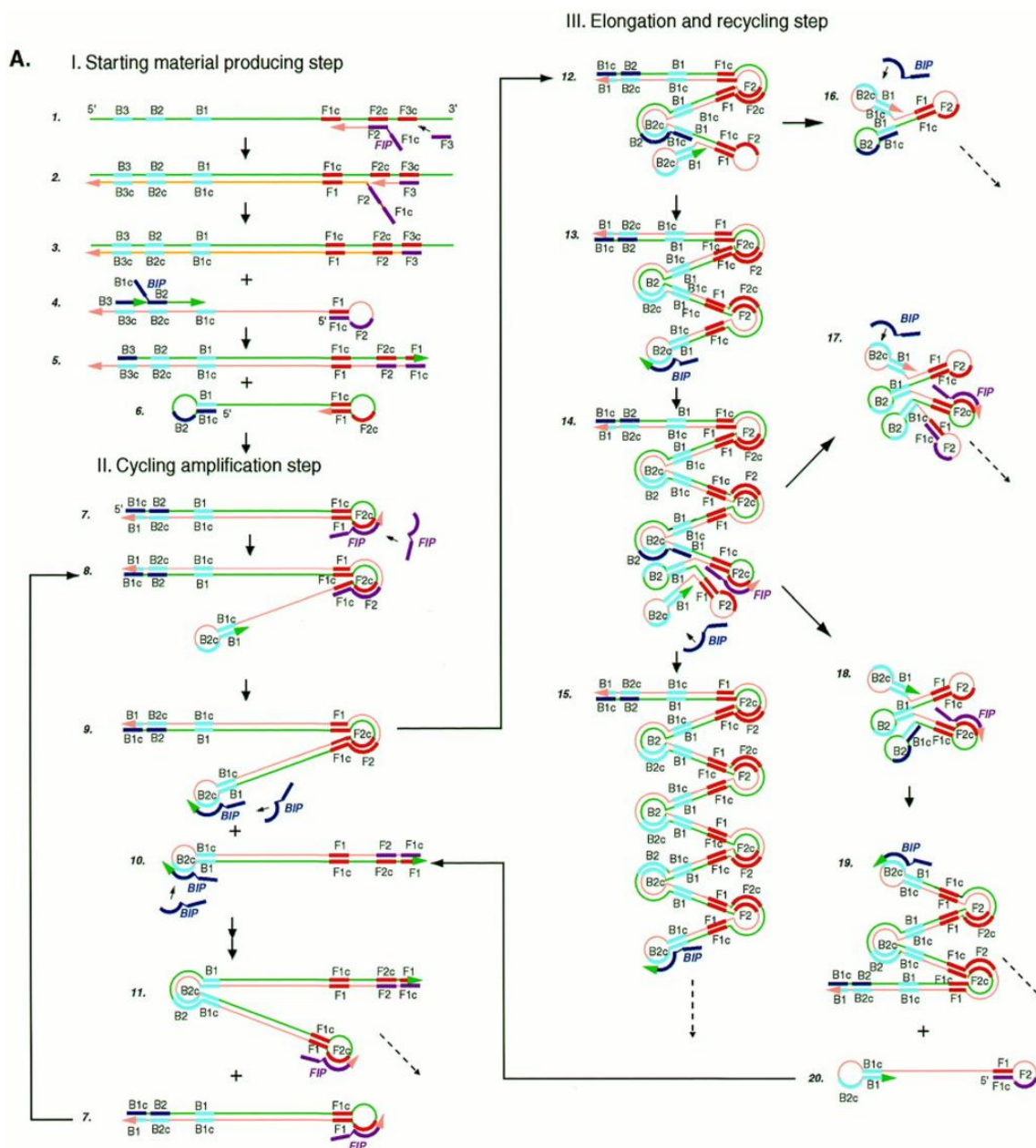
Pokud se chceme ujistit, že se skutečně jedná o DNA *T. contejeani*, je možné produkt ještě osekvenovat.

9.3.4. LAMP metoda

Metoda LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) je alternativou k běžněji používané detekci pomocí PCR. Slouží také k namnožení DNA, ale na rozdíl od PCR probíhá za izotermických podmínek, tedy bez potřeby termocycleru. Využívá k tomu tzv. „strand displacing“ DNA polymerázu a sadu čtyř speciálně vyvinutých primerů, které rozpoznávají celkem 6 různých sekvencí na templátové DNA. Vnitřní primer iniciuje LAMP tím, že zahájí syntézu nového vlákna, zatímco původní vlákno je odvrženo. Následně nasedne vnější primer, jenž započne syntézu dalšího vlákna, přičemž předchozí nasyntetizované vlákno je odpojeno. To pak slouží jako templát DNA syntézy iniciované druhým vnitřním a vnějším primerem, které nasednou na opačný konec vlákna, než ty původní. Při postupném LAMP zacyklení vždy jeden vnitřní primer nasedne na smyčku produktu a iniciuje odpojení původního vlákna. Výsledkem jsou tedy vždy jedno vlákno totožné s původním a jedno s dvojnásobnou délkou. Podrobněji je tento proces popsán na obr. 9. Reakce pokračuje rychlostí 10^9 kopií za méně než hodinu. Finálním produktem je DNA s repeticemi původní DNA a s květákovitou strukturou s mnoha smyčkami (Notomi a kol., 2000). Optimální reakční podmínky

pro detekci *T. contejeani* při použití 4 primerů (FIP, BIP, F3, B3) jsou 45 minut při 65 °C (El-Matbouli a Soliman, 2006).

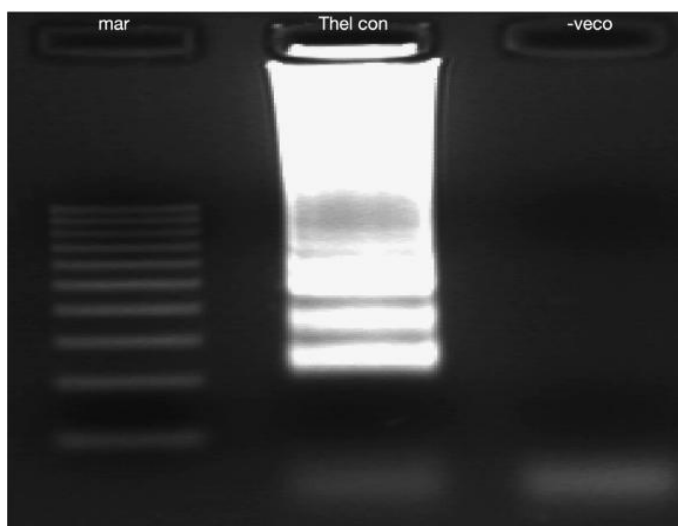
K zesílení a urychlení reakce slouží přidání dvou tzv. *loop* primerů (LoopF, LoopB). To zvýší také citlivost metody i její specifitu (Nagamine a kol., 2002).



Obrázek 9

Schematické zobrazení mechanismu LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Tento obrázek popisuje proces, který začíná od primeru FIP. Nicméně syntéza DNA může také začít primerem BIP. (převzato z práce Notomi a kol., 2000) I – krok, kdy se začnou tvořit nová vlákna, II – krok cyklení amplifikace, III – krok elongace a opakovaného zacyklení

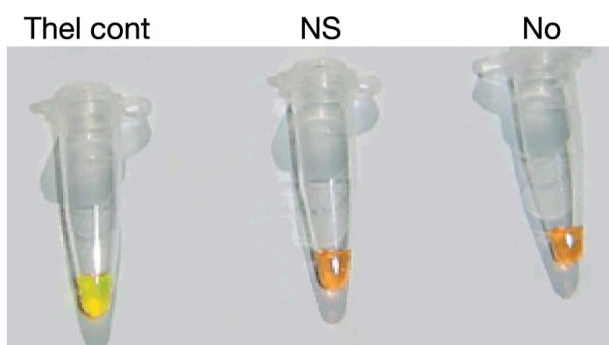
K detekci LAMP produktů slouží elektroforéza na 2% agarózovém gelu. V takovém případě se nejedná o jeden proužek, ale o množství proužků s fragmenty DNA o různé délce, jak je vidět na obr. 10.



Obrázek 10

Agarózový gel ukazující produkt LAMP metody specifické pro parazita *Thelohania contejeani*, který se jeví jako několik pruhů DNA různé délky. (převzato z práce El-Matbouli a Soliman, 2006) Sloupce: mar - 100bp DNA standard; Thel con - produkt reakce za přítomnosti DNA *T. contejeani* při použití primerů FIP, BIP, F3, B3, LoopF a LoopB; -veco - negativní kontrola bez templátu

Další možností je pak barvení barvivem SYBR Green I přímo v mikrozkuhavce (Notomi a kol., 2000; El-Matbouli a Soliman, 2006). V takovém případě dojde při přítomnosti produktu k obarvení na zeleno (viz obr. 11).



Obrázek 11

Vzhled produktů LAMP metody určené pro detekci parazita *Thelohania contejeani*. Produkty jsou vizualizovány barvivem SYBR Green I. (převzato z práce El-Matbouli a Soliman, 2006) Thel cont = pozitivní reakce pro *T. contejeani*, zelené zbarvení, NS = negativní výsledek, oranžové zbarvení, NO = negativní kontrola, bez DNA

Obě metody (LAMP i PCR) byly porovnávány při testování *T. contejeani*. Ani jedna nevynesla chybně pozitivní výsledek při testování nenakažených raků, ani u *T. montirivulorum* a *T. solenopsae*. Citlivost LAMP je o několik řádů vyšší než PCR. Pomocí LAMP metody byla detekována nákaza při ředění 10^{-7} , zatímco PCR jen do ředění 10^{-5} (El-Matbouli a Soliman, 2006). Výhodou PCR je však možnost osekvenovat výsledný produkt pro potvrzení, zda se opravdu jedná o DNA *T. contejeani*, což v případě LAMP možné není.

10. Závěr

Ačkoli byly v minulosti zaznamenány masové úhyny v račích populacích, které byly přisuzovány právě porcelánové nemoci, nejsou zprávy o tom, že by v poslední době byly pozorovány vysoké prevalence tohoto onemocnění. Zdá se, že při nízkém zastoupení nemocných raků (kolem 5 %) nákaza neohrožuje populaci. Zvýšení počtu nakažených jedinců však může vést k úhynům raků ve vyšších počtech, navíc může indikovat zhoršení životních podmínek v dané lokalitě. Proto by bylo vhodné míru nákazy v cenných račích populacích pravidelně kontrolovat.

Mnoho otázek týkajících se infekce *T. contejeani* již bylo objasněno, ale proces zkoumání tohoto parazita ještě rozhodně není u konce. Například stále není jisté, zda v jeho životním cyklu nefigurují i nějakí jiní hostitelé než raci. Literatura se také neshoduje v tom, jak moc jsou infikovaní raci parazitem ovlivněni, např. zda má porcelánová nemoc negativní vliv na jejich pohyblivost. Přestože žádná studie hodnotící tento jev přímo jej statisticky nepotvrdila, většina autorů konstatuje, že nemocní raci sníženou pohyblivost mají. Předpokládá se, že zhoršení životních podmínek raků může urychlit rozvoj nemoci v těle hostitele a rozšíření parazita v populaci. Velkým otazníkem však stále zůstává, které všechny faktory mohou mít vliv na projev infekce *T. contejeani* a její šíření a jak jsou významné.

Vzhledem k tomu, že teprve v poslední dekádě začaly být pro detekci *T. contejeani* využívány molekulární metody, byla naprostá většina geografické distribuce tohoto parazita zjištěna pomocí vizuálního zhodnocení nebo histologickým vyšetřením. Je tedy možné, že s hojnějším využíváním nových citlivějších metod se ukážou být tyto poznatky nepřesné a zjistí se např., že porcelánová nemoc u některých populací raků není způsobována *T. contejeani*, ale jinou mikrosporidií nebo že tento parazit napadá i jiné živočichy než raky.

Na poznatky shrnuté v této bakalářské práci hodlám navázat ve své práci diplomové, kde budu využívat molekulární metody pro detekci *T. contejeani* v populacích raků u nás. Hodlám detekovat nákazu nejen pomocí běžně používané *nested PCR*, ale i metodou LAMP, kterou, ač byla vyhodnocena jako citlivější než PCR, zatím autoři zkoumající *T. contejeani* příliš nevyužívali. Budu testovat populace různých druhů raků (původních i nepůvodních) se zahrnutím těch populací, kde již nákaza byla dokladována. Následně chci výsledky molekulárních metod porovnat s výsledky vizuální detekce porcelánové nemoci v populacích. Předpokládám, že molekulární metody odhalí více infikovaných raků. Pokusím se také

vysledovat vztah míry infekce k typu prostředí a dalším faktorům. Některé pozitivní výsledky budu ověřovat pomocí sekvenace DNA, abych odhalila případné nepřesnosti metod.

Výše nastíněný výzkum je potřebný, protože míra nákazy raků *T. contejeani* v českých vodách dosud nebyla studována a může objasnit, jaké faktory mají vliv na šíření a rozvoj porcelánové nemoci. Výsledky mojí práce budou poskytnuty Agentuře ochrany přírody a krajiny a bude možné z nich vycházet při plánování ochranných opatření pro naše původní druhy raků.

11. Seznam použitých zkratk

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

LAMP – metoda izotermální amplifikace (loop mediated isothermal amplification)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

SDS – dodecylsírán sodný

SPV – sporoformní měchýřek (sporophorous vesicle), v některých pracích se užívá také SPOV

Tris - trisaminomethan

12. Seznam literatury

- Arneberg, P., Skorpung, A., Grenfell, B. a Read, A. F.** (1998). Host densities as determinants of abundance in parasite communities. *Proc. R. Soc. London B* **265**, 1283 – 1289.
- Bakowski, M. A., Lualien, R. J. a Troemel, E. R.** (2014). Microsporidia infections in *Caenorhabditis elegans* and other nematodes. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 341-356.
- Bjorson, S. a Oi, D.** (2014). Microsporidia biological control agents and pathogens of beneficial insects. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 635-670.
- Bojko, J.** (2013). Does *Thelohania contejeani*, the causative agent of “porcelain disease” in crayfish, infect a range of aquatic macroinvertebrate hosts? Dizertační práce, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, Velká Británie.
- Brewis, J. M. a Bowler, K.** (1982). The growth of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* in Northumbria. *Freshw. Biol.* **12**, 187–200.
- Brown, A. M. V. a Adamson, M. L.** (2006). Phylogenetic distance of *Thelohania butleri* Johnston, Vernick, and Sprague, 1978 (Microsporidia; Thelohaniidae), a parasite of the smooth pink shrimp *Pandalus jordani*, from its congeners suggests need for major revision of the genus *Thelohania* Henneguy, 1. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**, 445–455.
- Brown, D. J. a Bowler, K.** (1977). A Population study of the British freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *Freshw. Crayfish* **3**, 33–49.
- Burba, A.** (1996). Stock, size composition, diseases and parasites of the crayfish, *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus* and *Orconectes limosus* in Lithuania. *Freshw. Crayfish* **11**, 213–218.
- Cali, A. a Takvorian, P. M.** (2014). Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 71-134.

- Cossins, A. R.** (1973). *Thelohania contejeani* Henneguy, microsporidian parasite of *Austropotamobius pallipes* Lereboullet - an histological and ultrastructural study. *Freshw. Crayfish* **1**, 151–164.
- Cossins, A. R. a Bowler, K.** (1974). An histological and ultrastructural study of *Thelohania contejeani* Henneguy, 1892 (Nosematidae), Microsporidian parasite of the crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. *Parasitology* **68**, 81–91.
- Čepička, I., Lukeš, J. a Vávra, J.** (2007). Protozoologie. In: **Volf, P. a Horák, P. (editoři)** *Paraziti a jejich biologie*, Triton, Praha, 50 - 137.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L., Dyková, I., Gelder, S. R., Henttonen, P., Jiravanichpaisal, P., Lom, J. a Söderhäll, K.** (2006). Pathogens, parasites and ectocommensals. In: **Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël, P. Y., Reynolds, J. D. a Haffner, P. (editoři)** *Atlas of Crayfish in Europe*, Muséum national d'Histoire naturelle, Paříž, Francie, 131–157.
- Diéguez-Uribeondo, J., Pinedo-Ruíz, J. a Muzquiz, J. L.** (1997). *Thelohania contejeani* in the province of Alava, Spain. *Bull. Fr. la Pêche la Piscic.* **347**, 749–752.
- Dunn, J. C., McClymont, H. E., Christmas, M. a Dunn, A. M.** (2009). Competition and parasitism in the native white clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* and the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in the UK. *Biol. Invasions* **11**, 315–324.
- Řuriš, Z., Horká, I., Buřič, M. a Kozák, P.** (2013). Ekologie raků. In: **Kozák, P., Řuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E. a Policar, T.** *Biologie a chov raků*. Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 223-248.
- Edgerton, B. F., Evans, L. H., Stephens, F. J. a Overstreet, R. M.** (2002). Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture* **206**, 57–135.
- El-Matbouli, M. a Soliman, H.** (2006). Molecular diagnostic methods for detection of *Thelohania contejeani* (Microsporidia), the causative agent of porcelain disease in crayfish. *Dis. Aquat. Organ.* **69**, 205–211.
- France, R. L. a Graham, L.** (1985). Increased microsporidian parasitism of the crayfish *Orconectes virilis* in an experimentally acidified lake. *Water. Air. Soil Pollut.* **26**, 129–136.

- Haddaway, N. R., Wilcox, R. H., Heptonstall, R. E. A., Griffiths, H. M., Mortimer, R. J. G., Christmas, M. a Dunn, A. M.** (2012). Predatory functional response and prey choice identify predation differences between native/invasive and parasitised/unparasitised crayfish. *PLoS One* **7**, e32229.
- Henneguy, F. a Thélohan, P.** (1892). Myxosporidies parasites des muscles chez quelques crustacés décapodes. *Annales De Micrographie* **4**, 617–643.
- Herbert, B. W.** (1988). Infection of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) by the microsporidium *Thelohania* sp. (Microsporida: Nosematidae). *J. Fish Dis.* **11**, 301–308.
- Holdich, D. M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Füreder, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Śmietana, P., a kol.** (2006). Species files. In: **Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël, P. Y., Reynolds, J. D. a Haffner, P. (editoři)** *Atlas of Crayfish in Europe*, Muséum national d'Histoire naturelle, Paříž, Francie, 49–130.
- Imhoff, E. M., Mortimer, R. J. G., Christmas, M. a Dunn, A. M.** (2009). Porcelain disease in white-clawed and signal crayfish in the UK. In: **Brickland, J., Holdich, D. M. a Imhoff, E. M. (editoři)** *Crayfish Conservation in the British Isles*, Proceedings of a conference held on 25th March 2009 in Leeds, Leeds, Velká Británie, 49–56.
- Imhoff, E. M., Mortimer, R. J. G., Christmas, M. a Dunn, A. M.** (2010). Non-lethal tissue sampling allows molecular screening for microsporidian parasites in signal, *Pacifastacus leniusculus* (Dana), and vulnerable white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *Freshw. Crayfish* **17**, 145–150.
- Imhoff, E. M., Mortimer, R. J. G., Christmas, M. a Dunn, A. M.** (2011). Invasion progress of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)) and displacement of the native white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* (Lereboullet)) in the River Wharfe, UK. *Freshw. Crayfish* **18**, 45–53.
- Imhoff, E. M., Mortimer, R. J. G., Christmas, M. a Dunn, A. M.** (2012). Horizontal transmission of *Thelohania contejeani* in the endangered white-clawed (*Austropotamobius pallipes*) and the invasive signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Parasitology* **139**, 1471–1477.
- Iwano, H. a Kurti, T. J.** (1995). Identification and isolation of dimorphic spores from *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae). *J. od Invertebr. Pathol.* **65**, 230–236.

- Jaklič, M. a Vrezec, A.** (2011). The first tropical alien crayfish species in European waters: the redclaw *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* **84**, 651–665.
- Jones, J. B.** (1980). Freshwater crayfish *Paranephrops planifrons* infected with the microsporidian *Thelohania*. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **14**, 45–46.
- Keeling, P. J.** (2014). Phylogenetic place of Microsporidia in the tree of Eukaryotes. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 195-202.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. a Wilson, A. C.** (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6196–6200.
- Kouba, A., Petrusek, A. and Kozák, P.** (2014). Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* **413**, 05p1 – 05p31.
- Kozák, P., Buřič, M. a Kouba, A.** (2013). Reprodukce a životní cyklus. In: **Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E. a Policar, T.** *Biologie a chov raků*. Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 189-222.
- Kozubíková, E. a Horká, I.** (2013). Nemoci, paraziti a kmenzátlové raků. In: **Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E. a Policar, T.** *Biologie a chov raků*. Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 249-280.
- Krupauer, V.** (1968). *Zlatý rak*. Nakladatelství České Budějovice.
- Kudo, R.** (1924). A biologic and taxonomic study of the Microsporidia. *Illinois Biol. Monogr.* **9**, 1–265.
- Lom, J., Nilsen, F. a Dyková, I.** (2001). *Thelohania contejeani* Henneguy, 1892: dimorphic life cycle and taxonomic affinities, as indicated by ultrastructural and molecular study. *Parasitol. Res.* **87**, 860–872.
- Longshaw, M., Stebbing, P. D., Bateman, K. S. a Hockley, F. A.** (2012). Histopathological survey of pathogens and commensals of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in England and Wales. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 54–59.

- Mažylis, A.** (1978). On *Astacus astacus* L. infected with *Thelohania contejeani* Henneguy. *Freshw. Crayfish* **4**, 472–473.
- McGriff, D. a Modin, J.** (1983). *Thelohania contejeani* parasitism of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in California. *Calif. fish game* **69**, 178–183.
- Moodie, E. G., Le Jambre, L. F. a Katz, M. E.** (2003a). *Thelohania montirivulorum* sp. nov. (Microspora: Thelohaniidae), a parasite of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae): fine ultrastructure, molecular characteristics and phylogenetic relationships. *Parasitol. Res.* **91**, 215–228.
- Moodie, E. G., Le Jambre, L. F. a Katz, M. E.** (2003b). *Thelohania parastaci* sp. nov. (Microspora: Thelohaniidae), a parasite of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Parasitol. Res.* **91**, 151–165.
- Mori, M. a Salvidio, S.** (2000). The occurrence of *Thelohania contejeani* Henneguy, a microsporidian parasite of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet), in Liguria Region (NW Italy). *J. Limnol.* **59**, 167–169.
- Nagamine, K., Hase, T. a Notomi, T.** (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* **16**, 223–229.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. a Hase, T.** (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, e63.
- Nylund, S., Nylund, A., Watanabe, K., Arnesen, C. E. and Karlsbakk, E.** (2010). *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a life cycle in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Eukaryot. Microbiol.* **57**, 95–114.
- Oidtmann, B., El-Matbouli, M., Fischer, H., Hoffman, R., Klärting, K., Schmid, I. a Schmidt, R.** (1996). Light microscopy of *Astacus astacus* L. under normal and selected pathological conditions, with special emphasis to porcelain disease and crayfish plague. *Freshw. Crayfish* **11**, 465–480.
- Quaglio, F., Capovilla, P., Fioravanti, M. L., Marino, F., Gaglio, G., Florio, D., Fioretto, B. a Gustinelli, A.** (2011). Histological analysis of thelohianiasis in white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* complex. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* **401**, 27p1–27p11.

- Quilter, C. G.** (1976). Microsporidan parasite *Thelohania contejeani* Henneguy from New Zealand freshwater crayfish. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **10**, 225–231.
- Rosewarne, P. J., Svendsen, J. C., Mortimer, R. J. G. a Dunn, A. M.** (2014). Muddied waters: suspended sediment impacts on gill structure and aerobic scope in an endangered native and an invasive freshwater crayfish. *Hydrobiologia* **722**, 61–74.
- Ryazanova, T. V. a Eliseikina, M. G.** (2010). Microsporidia of the genera *Thelohania* (Thelohaniidae) and *Ameson* (Pereziiidae) in two species of lithodid crabs from the Sea of Okhotsk. *Russ. J. Mar. Biol.* **36**, 435–442.
- Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Ruffini, M., Gibertini, G. a Marzano, F. N.** (2009). The new threat to Italian inland waters from the alien crayfish “gang”: the Australian *Cherax destructor* Clark, 1936. *Hydrobiologia* **632**, 341–345.
- Skurdal, J., Qvenild, T., Taugbol, T. a Fjeld, E.** (1990). A 6-year study of *Thelohania contejeani* parasitism of the noble crayfish, *Astacus astacus* L., in Lake Steinsfjorden, S. E. Norway. *J. Fish Dis.* **13**, 411–415.
- Skurdal, J., Taugbol, T., Fjeld, E., Hessen, D. O. a Hastein, T.** (1988). *Thelohania contejeani* Henneguy parasitizing the noble crayfish, *Astacus astacus* L., in Norway. *J. Fish Dis.* **11**, 433–435.
- Snowden, K. F.** (2014). Microsporidia in higher vertebrates. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 469–492.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Feist, S. W., Chambers, E. a Stone, D. M.** (2013). Plastic parasites: Extreme dimorphism creates a taxonomic conundrum in the phylum Microsporidia. *Int. J. Parasitol.* **43**, 339–352.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Small, H. J., Moss, J., Shields, J. D., Reece, K. S. a Tuck, I.** (2010). *Myospora metanephrops* (n. g., n. sp.) from marine lobsters and a proposal for erection of a new order and family (Crustaceacida; Myosporidae) in the class Marinosporidia (Phylum Microsporidia). *Int. J. Parasitol.* **40**, 1433–1446.
- Stentiford, G. D. a Dunn, A. M.** (2014). Microsporidia in aquatic invertebrates. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 579–604.

- Sumari, O. a Westman, K.** (1969). The crayfish parasite *Thelohania contejeani* Henneguy (Sporozoa, Microsporidia) found in Finland. *Ann. Zool. Fennici* **7**, 193 – 194.
- Štambergová, M., Bádr, V. a Ďuriš, Z.** (2005). Decapoda (desetinožci). In: **Farkač, J., Král, D. a Škorpík, M. (editoři)** *Červený seznam ohrožených druhů České republiky Bezobratlí*, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 100 – 101.
- Štambergová, M., Svobodová, J. a Kozubíková, E.** (2009). Ohrožení a ochrana populací raků a jejich biotopů. In: **Štambergová, M., Svobodová, J. a Kozubíková, E.** *Raci v České republice*, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 127–168.
- Štěpán, V. J.** Soudobý stav rakařství v Čechách. *Československý rybář* **1932-33**, 20.
- Vávra, J. a Larsson, J. I. R.** (2014). Structure of Microsporidia. In: **Weiss, L. M. a Becnel, J. J. (editoři)** *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Velká Británie, 1-70.
- Vey, A. a Vago, C.** (1973). Protozoal and fungal diseases of *Austropotamobius pallipes*, Lereboullet in France. *Freshw. Crayfish* 165–179.
- Vossbrinck, C. R. a Debrunner-Vossbrinck, B. A.** (2005). Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol. (Praha)*. **52**, 131–142.

Sekundární citace

- Alderman, D. J. a Polglase, J. L.** (1988). Pathogens, parasites and commenzals. In *Freshwater crayfish: Biology, Management and Exploitation*, Croom Helm, Londýn, Velká Británie, 167–212.
- Fischer, H.** (1992). The porcelain disease of the freshwater crayfish *Astacus astacus* L., caused by *Thelohania contejeani*. DVM Thesis, Tierärztliche Fakultät, Universität München, Mnichov, Německo.
- Hoffman, R. W., El-Matbouli, M., Oidtmann, B. a Fischer, H.** (1999). Light and electron microscopic studies on porcelain disease (*Thelohania contejeani*) in noble crayfish (*Astacus astacus*). *Freshw. Crayfish* **12**, 933–934.
- Iversen, E. S. a Kelly, J. K.** (1976). Microsporidiosis successfully transmitted experimentally in pink shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* **27**, 407–408.

Krucinska, J. a Simon, E. (1968). On the parasites and epibionts of the branchial cavity in crayfish at Wroclaw and vicinity. *Prz. Zool.* **12**, 288–290.

Schäperclaus, W. (1954). *Fischkrankheiten*. Akademie-Verlag, Berlin, Německo.

Voronin, V. N. (1971). New data on microsporidiosis of the crayfish, *Astacus astacus* (L. 1758). *Parazitologiya* **5**, 186–191.